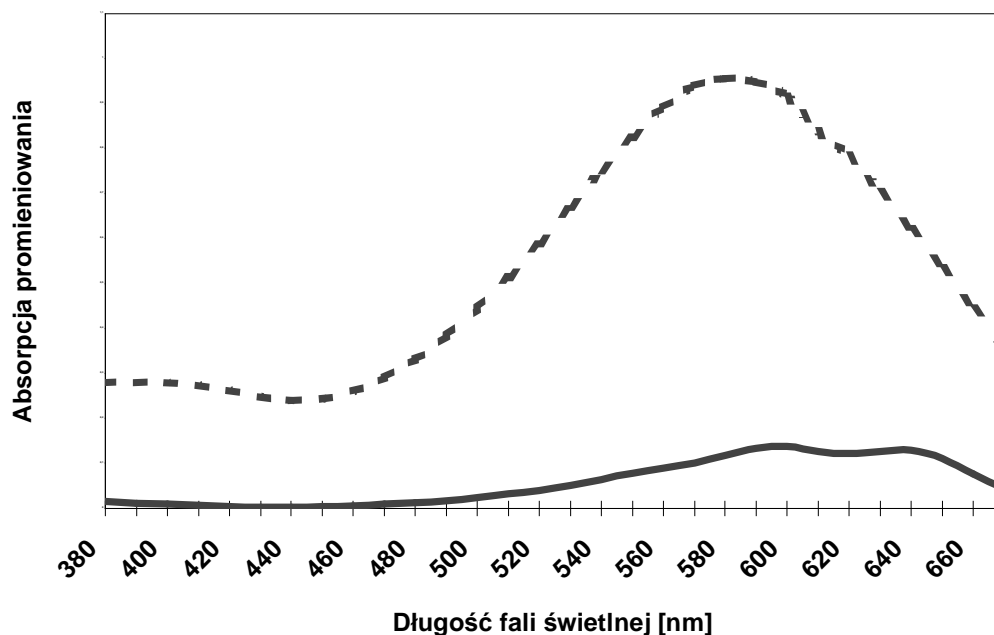


Spektrofotometria w świetle widzialnym.

Oznaczenia spektrofotometryczne w zakresie światła widzialnego (VIS) i nadfioletu (UV) polegają na pomiarze absorpcji promieniowania elektromagnetycznego.

Zależność wielkości absorpcji promieniowania monochromatycznej wiązki światła widzialnego jest charakterystyczna dla substancji posiadających właściwość różnej absorpcji promieniowania o różnych długościach fali. Substancje o takich właściwościach są barwne. Zależność wielkości absorpcji promieniowania od długości fali świetlnej nosi nazwę widma absorpcyjnego. Widma substancji barwnych mają kształt charakteryzujący się występowaniem maksimum na krzywej absorpcji.

Rys. 1. Przykładowe widmo absorpcji substancji barwnej w zakresie VIS.

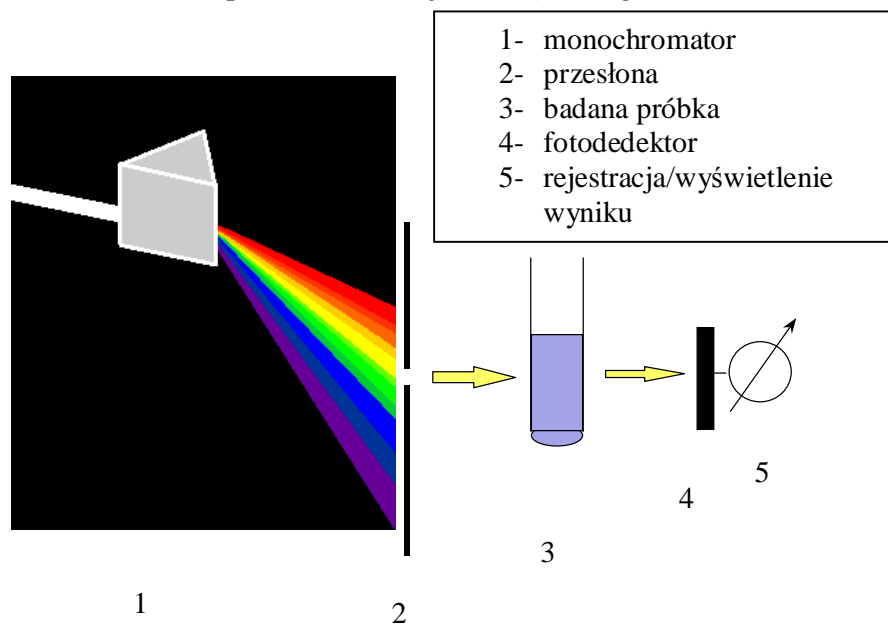


W przypadku pomiarów w zakresie VIS wiązka promieniowania przechodząca przez barwny roztwór ulega częściowej absorpcji proporcjonalnej do ilości cząstek substancji pochłaniających promieniowanie i znajdujących się na drodze przechodzącej wiązki. Ilość cząstek substancji w roztworze jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu – można więc za pomocą tej metody dokonywać pomiarów stężenia substancji barwnych.

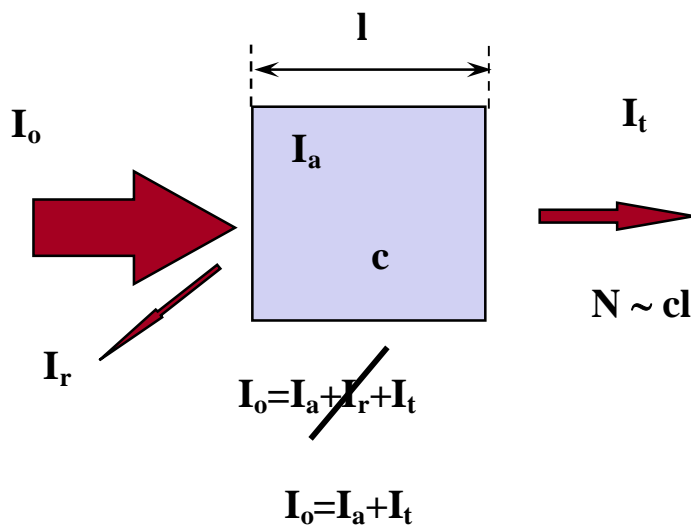
W najprostszym przypadku pomiary fotometryczne mogą być wykonywane metodą wizualną, która polega na porównaniu intensywności zabarwienia badanej próbki ze skalą wzorców (szeregiem próbek roztworów badanej substancji o różnych stężeniach).

Dokładniejsze wyniki można uzyskać z wykorzystaniem metod instrumentalnych przy użyciu prostych urządzeń zwanych kolorymetrami lub fotokolorymetrami (fotometrami, absorpcjometrami). Urządzenia te umożliwiają uzyskanie monochromatycznej wiązki promieniowania widzialnego przy pomocy filtrów szklanych, co powoduje powstanie wiązki o stosunkowo dużej szerokości przez co dokładność pomiarów jest obniżona. W urządzeniach o wyższej dokładności, spektrofotometrach, monochromatyczna wiązka uzyskiwana jest przy pomocy pryzmatu lub siatki dyfrakcyjnej.

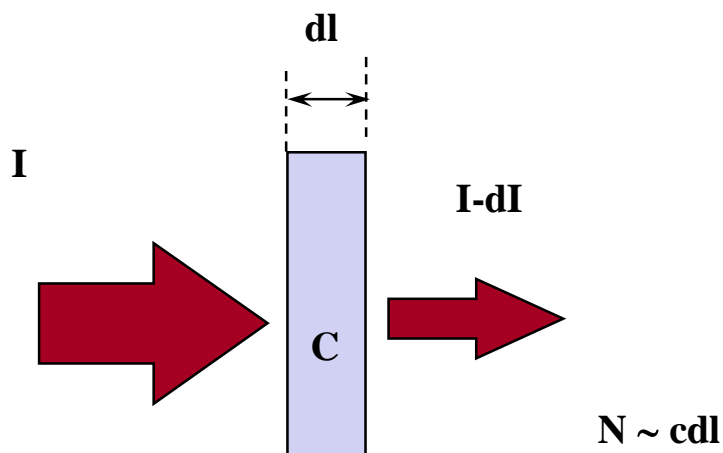
Rys. 2. Zasada działania spektrofotometru jednowiązkowego.



Ilościowo zjawisko to przeanalizować można rozpatrując sytuację w której wiązka promieniowania o natężeniu I_0 przechodzi przez warstwę barwnego roztworu o stężeniu c i grubości l . Ilość cząstek pochłaniających światło (N) jest proporcjonalna do grubości warstwy (l) roztworu i jego stężenia (c). Padające światło w niewielkim stopniu ulega odbiciu (I_r) i w pewnym stopniu zaabsorbowane w roztworze (I_a), pozostała część promieniowania (I_t) przechodzi przez roztwór.



Dokonując odpowiednich przekształceń matematycznych dla elementu roztworu o grubości dl otrzymujemy zależności wykorzystywane praktycznie przy wykonywaniu oznaczeń stężeń roztworów metodą spektrofotometryczną.



$$-dI = \varepsilon c dl I$$

ε - współczynnik absorpcji

$$\frac{dI}{I} = -\varepsilon c dl$$

$$\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I} = -\int_0^l \varepsilon c dl$$

$$\log \frac{I_t}{I_0} = -\varepsilon c l$$

$$\log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon c l$$

Wprowadzając pojęcia transmitancji T ($T = \frac{I_t}{I_0}$) i absorbancji A ($A = \log \frac{I_0}{I_t}$) (absorbancja określana jest czasami jako ekstynkcyja i oznaczana jako E) otrzymujemy poniższe zależności:

$$A = \varepsilon c l$$

$$\log T = -\varepsilon c l$$

Przy stałej wartości współczynnika absorpcji ε i grubości warstwy roztworu l zarówno transmitancja jak i absorbancja zależą od stężenia substancji. Ze względu na prostoliniowy charakter zależności $A=f(c)$ funkcja ta jest bardziej przydatna do celów analitycznych.

Techniką najczęściej wykorzystywaną do spektrofotometrycznego pomiaru stężeń jest metoda krzywej wzorcowej. Polega ona na przygotowaniu skali wzorców (kilku próbek oznaczanej substancji o dokładnie znanych stężeniach), wykonaniu pomiarów absorbancji

roztworów wzorcowych, ustaleniu relacji pomiędzy stężeniem oznaczanej substancji a absorbancją i następnie wykonaniu pomiarów absorbancji próbek o nieznanym stężeniu. Na podstawie ustalonej, według skali wzorców, zależności np. $c=f(A)$ dokonuje się przeliczenia zmierzonej absorbancji na stężenie oznaczanej substancji.

Celem ćwiczenia jest:

- nabywanie umiejętności przygotowywania roztworów wzorcowych
- zapoznanie się z podstawowymi zasadami obsługi spektrofotometru
- wykonywanie oznaczeń spektrofotometrycznych substancji barwnych w zakresie światła widzialnego
- opracowanie wyników oznaczeń

Przed zajęciami laboratoryjnymi należy zapoznać się z następującymi zagadnieniami:

- przeliczanie stężeń i rozcieńczanie roztworów
- prawo Lamberta-Beera
- widma absorpcji
- absorbancja i transmitancja
- metoda najmniejszych kwadratów

Przebieg ćwiczenia:

- a) analiza danych wejściowych
- b) ustalenie stężeń skali wzorców i przeliczenia odmierzanych objętości roztworów
- c) sporządzenie szeregu r-rów wzorcowych (skala wzorców)
- d) zapoznanie się z zasadami obsługi spektrofotometru
- e) dobór kuwet pomiarowych
- f) pomiary widma absorpcji i określenie długości fali świetlnej, dla której występuje maksimum absorpcji
- g) dobór długości fali świetlnej i sprawdzenie kuwet pomiarowych
- h) pomiary spektrofotometryczne roztworów wzorcowych i analizowanej próbki
- i) wstępna kontrola uzyskanych wyników

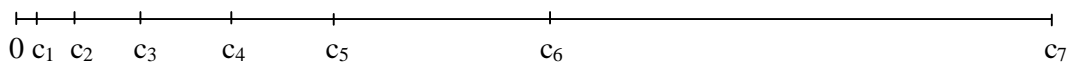
Ad a):

Grupa otrzymuje próbkę barwnej substancji o nieznanym stężeniu oraz podstawowy roztwór wzorcowy tej samej substancji o ściśle określonym stężeniu. Na podstawie tych informacji oraz dostępnego w laboratorium szkła należy określić zakres skali wzorców i ustalić metodykę jej przygotowania.

Ad b):

Należy dobrać 7 (+ zerowe) różnych stężeń we wcześniej przyjętym zakresie skali wzorców. Sposób przygotowania skali wzorców polega na precyzyjnym rozcieńczaniu r-ru podstawowego do uzyskania założonych stężeń.

Przy doborze kolejnych stężeń należy starać się dobierać je tak aby różnice pomiędzy kolejnymi stężeniami wzrastały wraz ze wzrostem stężenia np.:



Opracowując procedurę rozcieńczania należy pamiętać o praktycznych aspektach jej przygotowania mających istotny wpływ na dokładność późniejszych wyników:

- podczas rozcieńczania należy unikać odmierzenia objętości mniejszych niż 0,5 - 1 ml
- najwyższą dokładność odmierzanych objętości roztworu podstawowego uzyskamy korzystając z pipet jednomiarowych. W miarę możliwości należy dobierać stężenia skali wzorców tak aby można ją przygotować wykorzystując dostępne pipety jednomiarowe.

Ad c):

Przygotowanie szeregu roztworów roboczych, o zazwyczaj niewielkich stężeniach, z roztworu podstawowego, o wysokim stężeniu, wymaga wielokrotnego rozcieńczenia.

W celu minimalizacji błędów należy:

- jeżeli jest to tylko możliwe odmierzać objętości roztworów pipetami jednomiarowymi, dopiero w następnej kolejności należy stosować pipety wielomiarowe, a w ostateczności dzielić odmierzaną objętość na porcje
- pipety przepłukiwać odmierzonym roztworem
- kolby przepłukiwać wodą

Ad d):

Po przygotowaniu skali wzorców prowadzący zademonstruje sposób wykonywania pomiarów przy użyciu wybranego spektrofotometru.

Ad e):

Do pomiarów spektrofotometrycznych wykorzystywana jest para kuwet pomiarowych. Powinny one w jednakowy sposób absorbować promieniowanie świetlne. Podstawowym warunkiem są więc jednakowe grubości warstwy roztworu. Praktycznie do pomiarów spektrofotometrycznych wykorzystywane są kuwety o długości drogi optycznej 1, 2 lub 5 cm. W obrębie poszczególnych typów kuwet mogą one jednak różnić się w niewielkim stopniu. Do pomiarów należy dobrać parę o dokładnie tej samej długości drogi optycznej np. dwie kuwetki opisane jako 0,997.

Ad f):

Należy wykonać pomiary absorbancji wybranego roztworu analizowanej substancji w celu ustalenia zależności pomiędzy absorbancją a długością fali świetlnej (widmo absorpcji). W oparciu o uzyskane wyniki należy określić, z dokładnością do 1 nm, długość fali świetlnej, przy której występuje maksimum absorpcji. Taka długość fali świetlnej, dla barwnych substancji, odpowiada barwie dopełniającej substancji.

Ad g):

Po ustaleniu długości fali świetlnej, przy której będą dokonywane pomiary, należy sprawdzić czy obie kuwety charakteryzują się jednakowym pochłanianiem promieniowania (zależy to głównie od stopnia ich zużycia i czystości). W tym celu, po nastawieniu spektrofotometru na dobraną długość fali, obie kuwety należy napęlnić wodą redestylowaną, umieścić je w przystawce pomiarowej spektrofotometru, ustalić zerową wartość absorbancji dla jednej z nich i dokonać pomiaru absorbancji dla drugiej kuwety. Jeżeli kuwety są identyczne to otrzymujemy zerową wartość absorbancji dla obu kuwet. W przypadku różnic należy określić wartość poprawki korygującej.

Ad h):

Należy wykonać pomiary absorbancji dla szeregu próbek skali wzorców oraz próbki badanej. Spektrofotometr jednowiązkowy wymaga kontroli i ustalania zerowej wartości absorbancji dla każdego wykonywanego pomiaru. W przystawce pomiarowej znajdują się dwie kuwety, z których jedna napełniona jest roztworem dla którego ustalamy zerową wartość absorbancji (np. wodą redestylowaną), a druga badanym roztworem. Przed każdym pomiarem na drodze wiązki promieniowania umieszcza się kuwetę odnośną i zeruje spektrofotometr, a następnie wykonuje się pomiar absorbancji próbki badanej. Wykonując pomiary w kolejności od stężenia najmniejszego do największego zmniejszamy błąd pomiaru.

Ad i):

Bezpośrednio po zakończeniu pomiarów należy upewnić się czy uzyskane wyniki nie zawierają błędów. Z teoretycznego kształtu zależności $A=f(c)$ wynika, że w układzie współrzędnych $A; c$ uzyskane punkty pomiarowe powinny tworzyć linię prostą.

Opracowanie wyników pomiarów

Opracowanie wyników pomiarów polega na:

- określeniu sposobu wykonania skali wzorców (wraz z odpowiednimi przeliczeniami)
- wykreśleniu widma absorpcji $A=f(\lambda)$
- określeniu długości fali świetlnej wybranej do wykonania pomiarów
- wykreśleniu zależności $c=f(A)$
- obliczeniu metodą najmniejszych kwadratów współczynników prostej wzorcowej z podaniem wartości współczynnika korelacji
- obliczeniu stężenia oznaczanej substancji w badanej próbce
- tabelarycznym zestawieniem uzyskanych wartości mierzonych i wyników obliczeń
- opracowaniu wniosków

Przykład obliczeniowy:

Przygotowanie skali wzorców:

Podaj procedurę przygotowania fotometrycznej analizy barwnej substancji X dysponując następującymi danymi:

- stężenie substancji X w badanej próbce zawiera się w granicach 0 - 5 ppm;
- stężenie wzorcowego podstawowego roztworu substancji X wynosi 25 g/dm³;
- roztwory stanowiące skalę wzorców (7 stężeń) należy przygotować w kolbach miarowych o pojemności 0,2 dm³;

Minimalna objętość odmierzanych roztworów nie powinna być mniejsza niż 1 ml.

Na podstawie informacji dotyczącej spodziewanej zawartości substancji X w badanej próbce, uwzględniając odpowiedni margines bezpieczeństwa, można ustalić zakres stężeń jaki powinna pokrywać skala wzorców. Dla powyższego przykładu można przyjąć zakres skali wzorców od 0 do np. 8 ppm.

Następnym krokiem jest rozplanowanie stężeń poszczególnych roztworów stanowiących skalę wzorców. Jednym z możliwych zestawów może być 0; 0,1; 0,4; 0,8; 1,5; 2,5 ; 5 i 8 ppm.

W dalszej kolejności należy ustalić jakie powinno być stężenie roztworu roboczego, z którego można będzie przygotować wszystkie roztwory skali wzorców. Minimalna odmierzana objętość nie powinna być mniejsza niż 1 ml, a pojemność kolb do przygotowania skali wzorców wynosi 200 ml – oznacza to, że maksymalne rozcieńczenie jakie można uzyskać z wymaganą dokładnością wynosi 200 razy (odmierając 1 ml r-ru roboczego do kolby o pojemności 200 ml rozcieńczamy go 200x, odmierzenie każdej większej objętości oznacza niższy stopień rozcieńczenia). Na podstawie tego można wywnioskować, że najwyższe stężenie roztworu roboczego może wynosić $200 \times 0,1 \text{ ppm} = 20 \text{ ppm}$ (z roztworu o wyższym stężeniu nie uda się, przy powyższych założeniach, przygotować roztworu o stężeniu 0,1 ppm). Z drugiej strony stężenie roztworu roboczego nie może być niższe od najwyższego stężenia w skali wzorców, czyli w naszym przypadku 8 ppm. Z praktycznego punktu widzenia można brać pod uwagę dwa stężenia: 10 lub 20 ppm. Do dalszych obliczeń przyjmijmy, że roztwór roboczy będzie miał stężenie 20 ppm.

Ustalając stężenie roztworu roboczego, stężenia poszczególnych wzorców i pojemność kolb można obliczyć jakie objętości roztworu o stężeniu roboczym powinny zostać odmierzone do poszczególnych kolb, aby po uzupełnieniu ich wodą do kreski uzyskać założone wartości stężeń wzorców. Aby uzyskać roztwór o stężeniu 0,1 ppm należy r-ru roboczy rozcieńczyć 200x, aby uzyskać stężenie 5 ppm roztwór roboczy należy rozcieńczyć 4-krotnie. Wykonując 200-krotne rozcieńczenie w kolbie o pojemności 200 ml należy odmierzyć do kolby $1/200$ (pojemności kolby) roztworu rozcieńczonego, przy rozcieńczeniu 4-krotnym $1/4$ pojemności kolby. Daje to odpowiednio 1 i 50 ml. Wykonując analogicznie pozostałe przeliczenia otrzymujemy:

Nr kolby	Założone stężenie [ppm]	odmierzana objętość r-ru roboczego [ml]
0	0	0
1	0,1	1
2	0,4	4
3	0,8	8
4	1,5	15
5	2,5	25
6	5	50
7	8	80

Na tym etapie można dokonać korekty założonych stężeń. Najdokładniej odmierzamy objętości używając pipet jednomiarowych można więc zamiast 4 i 8 ml przyjąć 5 i 10 ml. Zmienia to odpowiednio założone stężenia na z 0,4 na 0,5 ppm i z 0,8 na 1,0 ppm.

Sumaryczna objętość r-ru roboczego potrzebna do uzyskania wszystkich roztworów skali wzorców wynosi 186 ml (przy skorygowanych stężeniach). Uwzględniając pojemność dostępnych kolb miarowych, rezerwę potrzebną do przepłukiwania pipet i ewentualnie popełniane błędy można przyjąć przygotowanie roztworu roboczego w kolbie o pojemności 250 lub 500 ml. Założmy przygotowanie r-ru roboczego w kolbie miarowej o pojemności 500 ml.

Roztwór roboczy należy przygotować przez odpowiednie rozcieńczenie r-ru podstawowego. Najwyższy stopień rozcieńczenia jaki możemy osiągnąć wynosi 500x (1 ml do kolby 500 ml). Stężenie r-ru podstawowego wynosi 25 g/l czyli 25 000 ppm (wymagany stopień rozcieńczenia wynosi więc $25\ 000/20 = 1\ 250$). Przy jednostopniowym rozcieńczaniu nie uzyskamy, przy przyjętych ograniczeniach, stężenia niższego niż $25\ 000/500 = 50$ ppm. Oznacza to, że roztwór podstawowy powinien zostać rozcieńczony dwustopniowo np. 50x w pierwszym kroku i 25x w następnym ($50 \times 25 = 1\ 250$). Przy przyjęciu takiej procedury po wstępnym rozcieńczeniu r-r będzie miał stężenie $25\ 000\ \text{ppm}/50 = 500$ ppm, a po ostatecznym rozcieńczeniu $500\ \text{ppm}/25 = 20$ ppm. Analizując „od końca” oznacza to, że r-r roboczy przygotowywany będzie z r-ru o stężeniu 500 ppm, a ten z kolei z roztworu o stężeniu 25 000 ppm.

Aby rozcieńczyć 25-krotnie r-r o stężeniu 500 ppm w kolbie o pojemności 500 ml należy odmierzyć go 20 ml. Uwzględniając, jak wyżej aspekty praktyczne, przyjmijmy, że przygotowujemy 100 ml roztworu o stężeniu 500 ppm.

100 ml r-ru o stężeniu 500 ppm uzyskamy odmierzając do kolby o tej pojemności 2 ml r-ru o stężeniu 25 000 ppm (rozcieńczenie 50-krotne).

Sumując wyniki obliczeń otrzymujemy praktyczną procedurę przygotowania skali wzorców:

- 2 ml roztworu podstawowego ($c_p = 25\ \text{g}/\text{dm}^3$) odmierzamy do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełniamy wodą do kreski i dokładnie mieszamy. Uzyskujemy r-r o stężeniu $c_{r1}=500$ ppm;
- 20 ml tak przygotowanego roztworu odmierzamy do kolby miarowej o pojemności 500 ml, uzupełniamy wodą do kreski i dokładnie mieszamy. Uzyskujemy r-r o stężeniu $c_{r2}=20$ ppm;
- do kolejnych kolb, pojemności 200 ml, odmierzamy odpowiednio, 0; 1; 5; 10; 15; 25; 50 i 80 ml. Po uzupełnieniu kolb do kreski i wymieszaniu uzyskujemy szereg roztworów o założonych stężeniach stanowiących skalę wzorców.

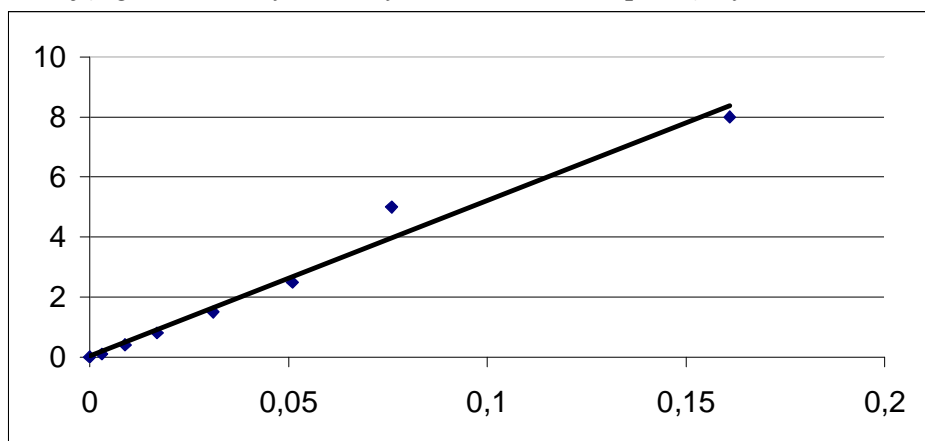
Opracowanie wyników:

Po wykonaniu pomiarów absorbancji, dla danych wg powyższego przykładu, otrzymano następujące wyniki:

Kolba	Absorbancja zmierzona	Absorbancja z uwzgl. poprawki
0	0,007	0,000
1	0,010	0,003
2	0,016	0,009
3	0,024	0,017
4	0,038	0,031
5	0,058	0,051
6	0,083	0,076
7	0,168	0,161
pr. badana	0,075	0,068

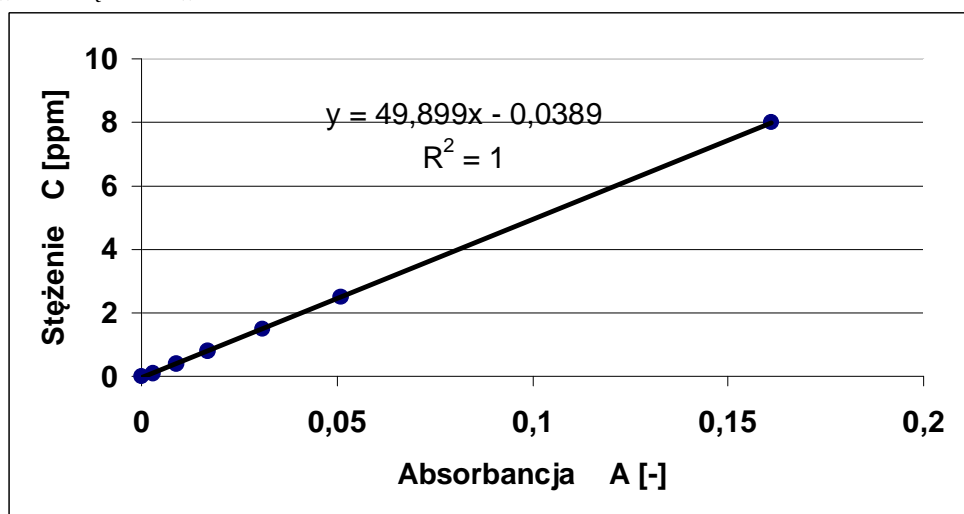
Wynik pomiaru absorpcji dla próbki zerowej wskazuje, że zastosowana para kuwet nie jest identyczna (pomiar absorpcji próbki zerowej zawierającej tylko wodę redestylowaną, przy ustaleniu zerowej wartości absorpcji dla wody redestylowanej, nie daje wartości zerowej). Uwzględnienie tej różnicy jako poprawki dla serii pomiarów wyeliminuje błąd spowodowany różną przepuszczalnością światła dobranej pary kuwet. Po uwzględnieniu poprawki uzyskujemy wartości zapisane w kolumnie „Absorbancja z uwzgl. poprawki”.

Przedstawiając graficznie uzyskane wyniki w układzie współrzędnych A;c:



można zauważyć, że punkt o współrzędnych 0,076; 5 odbiega od prostoliniowej zależności (zgodnej z teoretyczną) wytyczonej przez resztę pomiarów – do ustalenia zależności pomiędzy absorpcją a stężeniem zostanie on wyeliminowany.

Po eliminacji wyraźnie błędnego pomiaru i zastosowaniu metody najmniejszych kwadratów ustalamy wartości współczynników prostej tworzonej przez punkty pomiarowe w układzie współrzędnych A;c. Przedstawione poniżej wyniki uzyskano korzystając z programu „Excel” i jego standardowych funkcji „NACHYLENIE”, „ODCIĘTA” i „WSP.KORELACJI”.



Obliczone na tej podstawie stężenie oznaczanej substancji w badanej próbce wynosi:

$$C = 49,8993 * 0,068 - 0,03894 = 3,35 [ppm]$$

(dokładne wartości współczynników obliczane są podanymi wyżej funkcjami *Excels*, na wykresie prezentowane są ich wartości przybliżone).

Tabelaryczne zestawienia wartości obliczanych, mierzonych i wyników

Tab. 1. Dane wejściowe

Parametr		Wartość	Jednostka
Barwa substancji			
Stężenie r-ru podstawowego			
Orientacyjne stężenie substancji w badanej próbce			
Założone stężenia skali wzorców:	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
Pojemność kolb do przygotowania skali wzorców			

Tab. 2. Dane dotyczące przygotowania skali wzorców.

Parametr		Wartość	Jednostka
Przygotowanie roztworu (-ów) roboczych			
Pojemność kolby 1			
Odmierzona objętość r-ru podstawowego			
Pojemność kolby 2			
Odmierzona obj. r-ru roboczego z kolby 1			
Skala wzorców			
Odmierzane, do kolejnych kolb, objętości r-ru roboczego	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		

Współczynniki prostej wzorcowej	
$C = k * A + m$	
k =	
m =	
Współczynnik korelacji prostej wzorcowej	
R ² =	
Stężenie oznaczanej substancji w analizowanej próbce	
C _x =	

Notatki własne:

Te kartkę po wypełnieniu należy zostawić u prowadzącego

Data:

Skład zespołu:
 Przygotowujący sprawozdanie: _____ Pozostali członkowie zespołu: _____

Sprawdzający: _____

Tab. 1. Dane wejściowe

Parametr		Wartość	Jednostka
Barwa substancji			
Stężenie r-ru podstawowego			
Orientacyjne stężenie substancji w badanej próbce			
Założone stężenia skali wzorców:	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
	6		
	7		
	8		
Pojemność kolb do przygotowania skali wzorców			

Tab. 3. Wyniki pomiarów widma absorpcji

Grubość kuwet:.....

Przewidywana barwa światła, przy której wystąpi maksimum absorpcji:.....

λ [nm]	A [-]	λ [nm]	A [-]	λ [nm]	A [-]	λ [nm]	A [-]

Tab. 4. Wyniki pomiarów

Dobrana długość fali:.....

Roztwór do zerowania spektrofotometru:

Różnica (poprawka) absorbancji pomiędzy parą kuwet:

Próbka	Absorbancja	
	odczytana	z uwzgl. poprawki
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
Badana		

Tab. 2. Dane dotyczące przygotowania skali wzorców.

Parametr	Wartość	Jednostka
Przygotowanie roztworu (-ów) roboczych		
Pojemność kolby 1		
Odmierzona objętość r-ru podstawowego		
Pojemność kolby 2		
Odmierzona obj. r-ru roboczego z kolby 1		
Skala wzorców		
Odmierzane, do kolejnych kolb, objętości r-ru roboczego	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
	6	
	7	
	8	